

## 簡易プロトコル紹介： Dynabeads™を用いた細胞分離

注：この説明書は、英文添付文書の簡易訳です。製品に添付されている英文マニュアルも必ずご確認ください。

### \* ご案内 \*

細胞分離アプリケーションには、ビーズ粒径が 4.5 μm の製品（製品名に「M-450」が付く製品）またはビーズ粒径が 2.8 μm の製品（製品名に「M-280」または「M-270」が付く製品）をご利用ください。

## 推奨のバッファーと溶液

### Washing Buffer

抗体の結合した Dynabeads の洗浄には、蛋白質を加えた PBS を利用してください（製品プロトコルには「PBS/BSA」が紹介されています）。

- PBS/BSA： 最終濃度 0.1% (w/v) の BSA (Fraction V) を PBS, pH7.4 に加える。
- PBS/FBS： 最終濃度 2% (w/v) の FBS を PBS, pH7.4 に加える。
- PBS/HSA： 最終濃度 0.1% (w/v) の Human Serum Albumin を PBS, pH7.4 に加える。

### 細胞培養培地

RPMI 1640 / 10% FCS 等

## Dynabeads の前処理

- 1) Dynabeads を緩やかに混合して懸濁させる。
- 2) 必要量を試験管あるいはマイクロチューブに移す。
- 3) 試験管・マイクロチューブを 専用磁石 (DynaMag) にセットし 2 分間静置する。
- 4) 上清を除き、DynaMag から試験管・マイクロチューブをはずす。
- 5) 充分量の Washing Buffer\*を直ちに加える。
- 6) Dynabeads を緩やかに混合して懸濁させ 3) ~ 5) のステップを繰り返す。
- 7) 上清を除いた洗浄後のビーズに Washing Buffer を加え再懸濁させる。

## 一次抗体結合 Dynabeads による細胞の分離方法

### ≪目的細胞をビーズに結合させて分離する場合（ポジティブセレクション）≫

- 1) 細胞溶液に洗浄済みのビーズを加える。  
※細胞の収率を上げる為には『ビーズ濃度の条件』を満たす事が最も重要で、更に『目的細胞に対するビーズの個数の条件』を満たすことが必要です。  
**ビーズ濃度の条件：**  
目的細胞に結合させて分離する場合は、反応液中のビーズの濃度が最低  $1 \times 10^7$  個/mL 以上になるようにビーズを加える。  
**目的細胞に対するビーズの個数の条件：**  
目的とする細胞（ビーズが結合する細胞）1 個に対し、ビーズを 4 個以上\*\*加える。  
したがって、細胞溶液を調整できる時は目的細胞の最終濃度を  $2.5 \times 10^6$  個/mL 以上になるように調整し、目的細胞 1 個あたり、ビーズ 4 個以上を加えると良い。  
\*\* Dynabeads M-450 シリーズの場合。Dynabeads M-280 シリーズの場合は、5 個以上  
注) 血液から直接回収する場合など、細胞濃度の調整が困難な場合は、目的とする細胞 1 個に対し 4 個以上で必ず最終濃度が  $1 \times 10^7$  個/mL 以上になるようにビーズを加える。
- 2) 適量の Dynabeads を加えた細胞溶液を穏やかに混合しながら（サンプルミキサーを用いる等）20 分間  $4^\circ\text{C}$  でインキュベートする。  
※サンプルミキサーがない場合は最低 5 分間に 1 度緩やかに混合する。
- 3) インキュベート後、DynaMag にセットし 2 分間静置させ、ビーズ・細胞結合物を管壁に集め上清を除去する。  
全体の液量が少ない場合、他の細胞の巻き込みを避けるため、インキュベート後に DynaMag の磁石の高さ位まで Washing Buffer を加えてからセットしてもよい。
- 4) DynaMag から外し、Washing Buffer あるいは培地（例：RPMI 1640/10% FCS）等を加えビーズ・細胞結合物を再懸濁させる。
- 5) 3) ~ 4) を 2 ~ 3 回繰り返す、洗浄する。

### ≪不要細胞を除去する場合（ディプリーション）≫

- 1) 細胞溶液に洗浄済みのビーズを加える。  
**ビーズ濃度の条件：**  
不要細胞を除去する場合には、反応液中のビーズの濃度が  $2 \times 10^7$  個/mL 以上になるようにビーズを加える。  
**目的細胞に対するビーズの個数の条件：**  
不要な細胞の除去を目的とする場合にはビーズが結合する細胞 1 個に対し 4 個以上\*\*加える。  
\*\* Dynabeads M-450 シリーズの場合。Dynabeads M-280 シリーズの場合は、5 個以上
- 2) 適量の Dynabeads を加えた細胞溶液を穏やかに混合しながら 30 分間  $4^\circ\text{C}$  で（サンプルミキサーに設置する等）インキュベートする。  
※サンプルミキサーがない場合は最低 5 分間に 1 度緩やかに混合する。
- 3) DynaMag にセットし 2 分間静置させ、ビーズ・不要細胞結合物を管壁に集め目的細胞を含む上清を新しいチューブ等へ移す。  
全体の液量が少ない場合、他の細胞の巻き込みを避けるため、インキュベート後に DynaMag の磁石の高さ位まで Washing Buffer を加えてからセットしてもよい。

## 二次抗体結合 Dynabeads による細胞の分離方法

二次抗体結合 Dynabeads を利用する細胞分離には、一次抗体と二次抗体を結合させてから細胞と結合させる「直接法」(direct 法)と、予め細胞に一次抗体を結合してから二次抗体結合 Dynabeads を加える「間接法」(indirect 法)があります。

参考： 直接法・間接法の使い分けの目安

直接法	間接法
<ul style="list-style-type: none"><li>抗体値が高い一次抗体を使用</li><li>細胞表面に一次抗体が認識する抗原を多く発現</li><li>一次抗体を結合済みの Dynabeads をストックしたい場合</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>複数種類の一次抗体を混合して使用</li><li>ディプリーション効率を特に高めたい場合</li><li>抗体価が低い一次抗体を使用</li><li>細胞表面に一次抗体が認識する抗原はあまり多く発現しない場合</li><li>直接法による細胞分離後の純度に満足いかない場合</li></ul>

### 《直接法》

1×10<sup>7</sup> 個の二次抗体結合 Dynabeads M-280 あたり、0.8-3 μg の特異的一次抗体を加え上記ポジティブ分離あるいはディプリーションの方法に準じておこなう。

### 《間接法》

- 1) 細胞試料に一次抗体を加えて 4℃で 30 分間インキュベートする。  
利用する抗体は標的細胞及び抗原密度等によるが、通常、飽和状態になるように充分量加えることが好ましい。
- 2) 一次抗体で処理した細胞を遠心で集め(例：800 g、10 分間)上清を捨てるあるいは上清中の抗体を測定して抗体の結合量を調べる。
- 3) 一次抗体で処理した細胞を Hank's balanced salt solution (HBSS) pH7.4 で洗浄して、結合しなかった抗体を除去する。洗浄操作は少なくとも 2 回は行う。
- 4) 抗体で処理した試料に二次抗体結合 Dynabeads を加えて DynaMag で回収すれば、特異的な抗体の結合した細胞をその他の細胞から分離することができる。

## ストレプトアビジン結合 Dynabeads を用いる場合

ビオチン標識化された抗体を用いて細胞分離をおこなうこともできます。

### 《Dynabeads M-280 Streptavidin への抗体の結合》

- 1) Dynabeads M-280 Streptavidin を洗浄する。
- 2) 洗浄した Dynabeads にビオチン標識化された抗体を加える。  
(0.7~1.5 μg/10<sup>7</sup> 個 Dynabeads M-280 Streptavidin を目安とする)
- 3) ゆっくりローテートしながら、30 分間 4℃でインキュベートする。
- 4) DynaMag にセットし 2 分間静置させ、抗体が結合した Dynabeads を管壁に集め上清を除去する。
- 5) DynaMag より外し、PBS/BSA を加えてビーズを分散させる。
- 6) 4) ~ 5) を 4 回繰り返す。各洗浄ステップの間は静かに振って Dynabeads を再懸濁させる。

## 製品リスト

### 一次抗体結合 Dynabeads

(ヒト細胞用)

商品コード	商品名	梱包単位
DB11137	Dynabeads M-450 CD15 (myeloid cell)	5 mL(2 x 10 <sup>9</sup> cells 用)
DB11143	Dynabeads M-450 CD19 (pan-B)	5 mL(5 x 10 <sup>9</sup> cells 用)
DB11145	Dynabeads M-450 CD4 (T helper / inducer)	5 mL(2 x 10 <sup>9</sup> cells 用)
DB11147	Dynabeads M-450 CD8 (T cytotoxic/suppressor)	5 mL
DB11149	Dynabeads M-450 CD14 (monocytes/macrophages)	5 mL(2 x 10 <sup>9</sup> cells 用)
DB11151	Dynabeads M-450 CD3 (pan-T)	5 mL(2 x 10 <sup>9</sup> cells 用)
DB11153	Dynabeads M-450 CD45 (pan-leucocytes)	5 mL(5 x 10 <sup>8</sup> cells 用)
DB11155	Dynabeads M-450 CD31 Endothelial Cell	5 mL
DB11157	Dynabeads M-450 CD25	5 mL(5 x 10 <sup>9</sup> cells 用)
DB11159	Dynabeads M-450 CD2 (pan-T)	5 mL(1 x 10 <sup>9</sup> cells 用)
DB11363	Dynabeads Regulatory CD4+CD25+T Cell	1 x 10 <sup>9</sup> cell 用

(マウス細胞用)

商品コード	商品名	梱包単位
DB11441	Dynabeads Mouse pan B (B220)	5 mL(1 x 10 <sup>9</sup> cells 用)
DB11443	Dynabeads Mouse pan T (Thy1.2)	5 mL(2 x 10 <sup>9</sup> cells 用)
DB11445	Dynabeads Mouse CD4 (L3T4)	5 mL(2 x 10 <sup>9</sup> cells 用)
DB11447	Dynabeads Mouse CD8 (Lyt 2)	5 mL(2 x 10 <sup>9</sup> cells 用)

### 二次抗体結合 Dynabeads

商品コード	商品名	梱包単位
DB11041	Dynabeads Pan Mouse IgG	5 mL(2 x 10 <sup>9</sup> cells 用)
DB11042	Dynabeads Pan Mouse IgG	5 x 5 mL(10 x 10 <sup>9</sup> cells 用)
DB11031	Dynabeads M-450 Sheep anti-Mouse IgG	5 mL(2 x 10 <sup>9</sup> cells 用)
DB11033	Dynabeads M-450 Goat anti-Mouse IgG	5 mL(2 x 10 <sup>9</sup> cells 用)
DB11035	Dynabeads M-450 Sheep anti-Rat IgG	5 mL(2 x 10 <sup>9</sup> cells 用)
DB11039	Dynabeads M-450 Rat anti-Mouse IgM	5 mL(2 x 10 <sup>9</sup> cells 用)
DB11201	Dynabeads M-280 Sheep anti-Mouse IgG	2 mL
DB11202	Dynabeads M-280 Sheep anti-Mouse IgG	10 mL
DB11203	Dynabeads M-280 Sheep anti-Rabbit IgG	2 mL
DB11204	Dynabeads M-280 Sheep anti-Rabbit IgG	10 mL

### 表面活性化 Dynabeads

商品コード	商品名	梱包単位
DB14011	Dynabeads M-450 Epoxy	5 mL
DB14013	Dynabeads M-450 Tosylactivated	5 mL
DB14203	Dynabeads M-280 Tosylactivated	2 mL
DB14204	Dynabeads M-280 Tosylactivated	10 mL
DB14301	Dynabeads M-270 Epoxy	60 mg
DB14302	Dynabeads M-270 Epoxy	300 mg
DB14011	Dynabeads M-450 Epoxy	5 mL

### ストレプトアビジン結合 Dynabeads

商品コード	商品名	梱包単位
DB11047	Dynabeads Biotin Binder	5 mL(2 x 10 <sup>9</sup> cells 用)
DB11205	Dynabeads M-280 Streptavidin	2 mL
DB11206	Dynabeads M-280 Streptavidin	10 mL
DB60210	Dynabeads M-280 Streptavidin	100 mL
DB65305	Dynabeads M-270 Streptavidin	2 mL
DB65306	Dynabeads M-270 Streptavidin	10 mg/mL
DB11047	Dynabeads Biotin Binder	5 mL(2 x 10 <sup>9</sup> cells 用)

### Dynabeads 専用磁石 (DynaMag)

商品コード	商品名	説明	梱包単位
DB12301	DynaMag-15	15 mL チューブ 4 本立て	1 個
DB12302	DynaMag-50	50 mL チューブ 2 本立て	1 個
DB12303	DynaMag-5	5 mL チューブ 8 本立て	1 個
DB12320	DynaMag SPIN	1.5 mL チューブ 6 本立て	1 個
DB12321	DynaMag-2	1.5 mL または 2.0 mL チューブ 16 本立て	1 個

株式会社ベリタス 〒105-0013 東京都港区浜松町 1-10-14 住友東新橋ビル 3 号館 5 階

TEL 03-5776-0078 FAX 03-5776-0076

技術的なお問い合わせは：TEL 03-5776-0040 E-mail [techservice@veritastk.co.jp](mailto:techservice@veritastk.co.jp)